

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه دکترای حرفه ای در رشته پزشکی

عنوان:

بررسی اثر عصاره سیاه تخمه (*Agrostemma githago*) روی

پروماستیگوت های *لشمانیا ماژور* به روش MTT

اساتید راهنما:

دکتر بهنام محمدی قلعه بین

دکتر علی نیاپور

استاد مشاور:

دکتر شهاب بهلولی

نگارش:

فرناز دباغی

بهار سال ۱۳۹۵

شماره پایان نامه: ۰۵۶۵

سپاس:

خدایا! از کدام نعمت سخن بگویم و شکرانه می نعمت به جا آورم که نه

نعمت تور را پایانی است تا آن را بشمارم و نه مراتون به جا آوردن

شکرانه می نعمت تو. حمد و سپاس خدایی را هنر است که تیر حتمی قضایش

را هیچ سیری نمی شکند و لطف و محبت و هدایتش را هیچ مانعی باز نمی

دارد.

تقدیم بہ:

پدر و دلسوز و مادر مہربانم

تقدیم بہ آن دو کہ وجودشان برایم از ہر مدد کی بالاتر است

آنان کہ وجودم برایشان ہمہ رنج بودہ و وجودشان برایم ہمہ مہر

آنان کہ راست قامتی ام در شکستگی قاتشان تجلی یافت

توانشان رفت تابہ توانایی برسم، مویشان سپید کشت تار و سپید بانم

آنان کہ فروغ نگاہشان، گرمی کلامشان و روشنی رویشان سرمایہ های جاودانی

زندگی من است

و تقدیم به برادران مهربان و دلسوزم، فرید و علی سان و الهه می عزیزم
در برابر وجود کرامی شان زانوی ادب بر زمین می زنم و بادی مملو از عشق و
خضوع دستان پر مهرشان را می بوسم.

داستان کارآموز رنج استادش است...

تقدیم به اساتید بزرگوارم:

جناب آقای بهنام محمدی و جناب آقای دکتر علی نیاپور

آنان که به من نشان دادند که باید راهی باشد

و آنان که قدم به قدم برای این پایان نامه مرایاری کردند

و تقدیم به اساتید بزرگوارم که تا پایان عمرمدیون زحمات بی دریغشان،

هستم...

کسانی که محبت ایشان فراتر از مرز اندازه ها و راهنمایی ایشان فراتر از مرز

دانش هست...

بانشکراز

جناب آقای دکتر شهاب بهلولی

و سرکار خانم مرضیه شریفی

اساتید محترم داور: جناب آقای دکتر محمد شاهی، آقای دکتر پیری و آقای

دکتر میرزا اثراد

و تمامی عزیزانی که مراد انجام این طرح یاری نمودند.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
چکیده‌ی فارسی	۱

فصل اول: طرح تحقیق

۱-۱- مقدمه و بیان مسئله	۴
۱-۲- روش اجرای طرح	۵
۱-۳- تعریف واژه‌های کلیدی	۶
۱-۴- اهداف تحقیق	۶
۱-۴-۱- هدف کلی	۶
۱-۴-۲- اهداف اختصاصی	۶
۱-۴-۳- اهداف کاربردی	۷
۱-۵- فرضیات یا سؤالات تحقیق	۷

فصل دوم: پیشینه‌ی تحقیق

مقدمه	۹
۲-۱- کلیاتی در مورد لیشمانیوز	۹
۲-۱-۲- تعریف لیشمانیوز	۹
۲-۲- اشکال مختلف بیماری لیشمانیوز	۱۰
۲-۲-۱- لیشمانیوز احشایی	۱۰

۱۱	۲-۲-۲- لیشمانیوز جلدی
۱۲	۲-۳- سیمای بالینی لیشمانیوز جلدی
۱۲	۲-۳-۱- لیشمانیوز جلدی شهری یا انسان دوست
۱۳	۲-۳-۲- لیشمانیوز جلدی روستایی یا حیوان دوست
۱۴	۲-۳-۳- لیشمانیوز جلدی منتشر
۱۴	۲-۳-۴- لیشمانیوز جلدی - مخاطی
۱۵	۲-۳-۵- لیشمانیوز مزمن راجعه
۱۵	۲-۴- تاریخچه
۱۵	۲-۵- مورفولوژی
۱۷	۲-۶- چرخه زندگی
۱۸	۲-۷- ایمنی شناسی لیشمانیازیس
۱۹	۲-۸- انتقال و سرایت بیماری
۱۹	۲-۸-۱- روش اصلی انتقال
۲۰	۲-۸-۲- روش های فرعی انتقال
۲۱	۲-۹- درمان لیشمانیوز
۲۲	۲-۹-۱- درمان لیشمانیازیس احشایی
۲۲	۲-۹-۲- درمان لیشمانیازیس جلدی
۲۴	۲-۹-۳- سرما درمانی
۲۴	۲-۹-۴- گرمای کنترل شده لوکالیزه شده

۲۵CO ₂ Laser -۲-۹-۵
۲۵مقاومت یا عدم پاسخ به درمان -۲-۹-۶
۲۶اپیدمیولوژی و مطالعات -۲-۱۰
۲۶اپیدمیولوژی لیشمانیوز در جهان -۲-۱۰-۱
۲۷مطالعات لیشمانیوز در جهان -۲-۱۰-۲
۲۹اپیدمیولوژی لیشمانیوز پوستی و احشایی در ایران -۲-۱۰-۳
۳۰مطالعات لیشمانیوز پوستی و احشایی در ایران -۲-۱۰-۴
۳۱توصیف بیماری لیشمانیوز در استان اردبیل -۲-۱۰-۵
۳۱اثر آنتی لیشمانیایی برخی از گیاهان داروئی -۲-۱۱
۳۱Tanacetum parthenim -۲-۱۱-۱
۳۲Allium cepa -۲-۱۱-۲
۳۲Zhumeria majdae -۲-۱۱-۳
۳۳Aloe vera -۲-۱۱-۴
۳۳Peganum harmala -۲-۱۱-۵
۳۴Agrostemma githago -۲-۱۲
۳۵استخراج عصاره آبی از گیاه سیاه تخمه -۲-۱۲-۱
۳۵مطالعات انجام شده در مورد Agrostemma githago -۲-۱۲-۲

فصل سوم: مواد، دستگاه ها و روش ها

۳۸نوع پژوهش -۳-۱
----	---------------------

۳۸	۳-۲-مواد آزمایشگاهی مورد استفاده در تحقیق
۳۹	۳-۳-تجهیزات آزمایشگاهی
۴۰	۳-۴-وسایل و ظروف مورد استفاده
۴۰	۳-۵-روش تهیه مواد استفاده شده در تحقیق
۴۰	۳-۵-۱-محیط کشت BHI با حجم یک لیتر
۴۱	۳-۵-۲-محلول PBS(1X) با حجم یک لیتر
۴۱	۳-۵-۳-محلول MTT
۴۱	۳-۵-۴-محلول تریپان بلو ۰.۴٪
۴۲	۳-۶-روش کار
۴۲	۳-۶-۱-کشت انگل
۴۲	۳-۶-۲-استخراج عصاره آبی از گیاه سیاه تخمه
۴۳	۳-۶-۳-بررسی اثر کشندگی رقت های گوناگون عصاره گیاه سیاه تخمه بر انگل لیشمانیا ماژور
۴۳	۳-۶-۴-سنجش MTT
۴۴	۳-۶-۵-شمارش با رنگ آمیزی تریپان بلو
۴۵	۳-۷-ملاحظات اخلاقی

فصل چهارم: نتایج

۴۷	۴-۱-نتایج به دست آمده مربوط به بررسی اثر ضد لیشمانیایی دانه ی گیاه <i>Agrostemma githago</i>
۴۷	و گلوکانتیم به عنوان داروی استاندارد

- ۴-۱-۱- نتایج حاصل از بررسی اثر دانه گیاه عصاره *Agrostemma githago* در ۸ غلظت مختلف
بر کاهش میزان بقای پروماستیگوت های انگل لیشمانیا ماژور به روش MTT ۴۷
- ۴-۱-۲- نتایج حاصل از بررسی اثر گلوکانتیم در ۶ غلظت مختلف بر کاهش میزان بقای پروماستیگوت
های انگل لیشمانیا ماژور به روش MTT ۴۹
- ۴-۱-۳- نتایج حاصل از بررسی اثر عصاره ی دانه ی گیاه *Agrostemma githago* در ۸ غلظت
مختلف بر میزان کاهش رشد پروماستیگوت های انگل لیشمانیا ماژور به روش رنگ آمیزی تریپان بلو ۵۰

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

- ۵-۱- بحث ۵۴
- ۵-۲- نتیجه گیری ۵۸
- ۵-۳- پیشنهادات ۵۹
- منابع ۶۱
- چکیده ی انگلیسی ۷۱

فهرست نمودارها

عنوان	صفحه
نمودار ۱: تاثیر کشندگی غلظت های مختلف عصاره ی گیاه <i>Agrostemma githago</i> بر پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور به روش MTT.....	۴۸
نمودار ۲: تاثیر کشندگی غلظت های مختلف داروی گلوکانتیم بر پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور به روش MTT.....	۵۰
نمودار ۳: تاثیر کشندگی غلظت های مختلف عصاره ی گیاه <i>Agrostemma githago</i> بر پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور به روش رنگ آمیزی تریپان بلو.....	۵۲

بررسی اثر عصاره سیاه تخمه (*Agrostemma githago*) روی پروماستیگوت

های لیشمانیا مازور به روش MTT

چکیده

مقدمه و هدف: لیشمانیوز گروهی از بیماری های عفونی است که توسط گونه های مختلف جنس لیشمانیا ایجاد می شود و تظاهرات بالینی آن به فرم های جلدی، جلدی مخاطی، احشایی و جلدی منتشر دیده می شود. در حال حاضر، ۱۲ میلیون نفر در جهان با این بیماری درگیر هستند و ۳۵۰ میلیون نفر در معرض ابتلا می باشند و تخمین زده شده سالیانه دو میلیون ابتلای جدید به آنها اضافه شود. ایران جزو کشورهایی است که لیشمانیوز جلدی در آن شایع است. داروهای خط اول مورد استفاده در درمان لیشمانیوز، ترکیبات ۵ ظرفیتی آنتیموان (گلوکانتیم) می باشد که دارای عوارض جانبی متعدد مثل مسمومیت دارویی می باشد. از سوی دیگر مقاومت انگل نسبت به این دارو در نقاط مختلف جهان در حال افزایش می باشد. داروهای خط دوم از جمله آمفوتریسین B و میلتفوسین دارای عوارض سو دارویی و محدودیت استفاده در تمام بیماران بوده و هزینه بالایی را به بیماران تحمیل می نماید. با توجه به اثر سیتوتوکسیک و ضد سرطانی عصاره سیاه تخمه این مطالعه با هدف ارزیابی اثرات ضد لیشمانیایی عصاره سیاه تخمه (*Agrostemma githago*) در مقایسه با داروی گلوکانتیم با استفاده از روش رنگ سنجی MTT انجام گرفت.

مواد و روش ها: بعد از کشت انگل های لیشمانیا مازور در محیط کشت BHI، تعداد $2/5 \times 10^6$

پروماستیگوت در فاز ایستا به هر چاهک از پلیت های ۹۶ خانه اضافه گردید. عصاره سیاه تخمه در رقت های مختلف (۱، ۲، ۳، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۶ میلی گرم بر میلی لیتر) به چاهک ها اضافه شد. به عنوان گروه کنترل از داروی گلوکانتیم استفاده گردید. پلیت های کشت به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۴ درجه

سانتیگراد انکوبه شده، سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتیفریوژ و محلول رویی خارج شده، ۵۰ میکرولیتر MTT اضافه گردید. بعد از ۳ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۴ درجه و سانتیفریوژ در دمای چهار درجه، محلول رویی جدا و ۱۰۰ میکرولیتر حلال DMSO افزوده شد. بعد از ۱۵ دقیقه جذب نوری با دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید. همچنین از روش رنگ آمیزی تریپان بلو برای ارزیابی اثر عصاره ی آگروستما روی پروماستیگوت های *لشمانیا* مازور استفاده گردید.

نتایج: نتایج نشان داد که رقت های مختلف عصاره باعث کاهش درصد حیات سلولی پروماستیگوت های *لشمانیا* مازور گردید که در مقایسه با گروه کنترل تفاوت آماری معنی دار داشت ($p < 0.05$). اثر عصاره بر کاهش درصد حیات سلولی وابسته به غلظت بود. در روش MTT، IC_{50} عصاره بر روی پروماستیگوت های انگل *لشمانیا* مازور ۰/۳۶۵ و گلوکانتیم ۷۱/۰۱ میلی گرم در میلی لیتر به دست آمد. همچنین نتایج روش تریپان بلو نشان داد با افزایش غلظت عصاره ی آگروستما میزان زنده مانى پروماستیگوت های *لشمانیا* مازور کاهش می یابد.

نتیجه گیری: عصاره آبی سیاه تخمه (*Agrostemmagithago*) نسبت به گلوکانتیم تاثیر بسیار قوی تری (حدود ۲۰۰ برابر) روی پروماستیگوت های *لشمانیا* مازور دارد که نیازمند مطالعات تکمیلی در زمینه تاثیر آن در شرایط *in vivo* و همچنین تاثیر آن روی سلول های میزبان می باشد.

واژه های کلیدی: *لشمانیا* مازور، سیاه تخمه، روش MTT

فهرست جداول

جدول ۱: نتایج حاصل از تاثیر عصاره دانه ی گیاه *Agrostemma githago* در غلظت های مختلف

روی پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور به روش MTT..... ۴۸

جدول ۲: نتایج حاصل از تاثیر گلوکانتیم در غلظت های مختلف روی پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور

به روش MTT..... ۴۹

جدول ۳: میزان زنده مانی پروماستیگوت های انگل لیشمانیا ماژور در غلظت های متفاوت عصاره

Agrostemma githago به روش رنگ آمیزی تریپان بلو..... ۵۱